

СОПОСТАВЛЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ДЕЙСТВИЯ ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ И ЭКЗОГЕННОЙ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ХЛОРОПЛАСТОВ ПШЕНИЦЫ*

Аннотация. Исследованы особенности действия высокой температуры и экзогенной H_2O_2 на процесс использования глутатиона, а также содержание каротиноидов в хлоропластах пшеницы сорта Шарг в течение 5, 10, 15, 30, 60 мин. В результате исследований была выяснена значительная роль глутатиона в поддержании функциональной активности хлоропластов при действии как высокой температуры, так и экзогенной H_2O_2 . Адаптивное увеличение содержания в хлоропластах каротиноидов уже через 5-10 мин. после начала действия исследуемых стрессоров говорит о важной роли данных соединений в защите фотосинтетических мембран.

Ключевые слова: антиоксидантная система (АО), глутатион, каротиноиды, экспозиция, стресс, адаптация.

Введение. В настоящее время показано, что при действии на растения различных неблагоприятных факторов внешней среды развивается окислительный стресс, характеризующийся усилением продукции активных форм кислорода (АФК), действие которых в значительной степени ограничивается за счет работы антиоксидантной (АО) системы, с помощью которой активные формы кислорода (АФК) ликвидируются без образования каких либо других токсичных соединений. Гидроксилрадикал очень реакционно способен, и бороться с ним, по-видимому, невозможно, поэтому системы антиоксидантной защиты нейтрализуют и обезоруживают более ранние формы АФК – синглетный кислород, супероксидрадикал и перекись водорода. Среди соединений-антиоксидантов различают высокомолекулярные – ферменты и низкомолекулярные соединения, к которым по своей важности относят восстановленный глутатион, способствующий неферментативно или с помощью ферментов нейтрализации АФК, возникающих в результате контакта с мембранами [9; 2].

Восстановленный глутатион представляет собой пептид, состоящий из остатков трёх аминокислот (глутамат, цистеин, глицин). Содержание глутатиона в растительных клетках составляет от 0,2 -10 мМ [3]. У растений этот пептид является источником восстановленной серы, донором атомов водорода. Основной пул глутатиона в растительной клетке находится в восстановленном состоянии и только в покоящихся семенах – в окисленном. Редокс-превращения глутатиона играют очень важную роль в поддержании клеточного окислительно-восстановительного баланса. В частности, он необходим для активации реакций аскорбат-глутатионного цикла, связанного с нейтрализацией перекиси водорода.

К соединениям-антиоксидантам относят и каротиноиды, которые есть у всех фототрофных организмов. Помимо участия в поглощении световой энергии они выполняют уникальную роль в тушении синглетного кислорода, а также благодаря комплексообразованию их боковых ненасыщенных углеводородных хвостов с полиеновыми кислотами они служат каналами выведения свободнорадикальных состояний из мембран [3].

* © Гамбарова Н.Г.

В последние годы появились публикации, в которых проведено сопоставление ответных реакций растений на различные экстремальные факторы [8]. Однако, несмотря на большое количество публикаций, посвященных этой теме, вопрос о механизмах, лежащих в основе ответа на действие стрессоров, а также о степени неспецифичности реакции растительного организма и возможных специфических чертах, зависящих от природы и интенсивности воздействия, остается слабо изученным. В связи с этим, целью представленного исследования явилось сопоставление общих и специфических проявлений нарушения окислительно-восстановительного равновесия в хлоропластах пшеницы при действии различных по природе стрессов. С этой целью были изучены характерные черты и индивидуальные особенности динамики активности низкомолекулярных антиоксидантов (глутатион и каротиноиды) хлоропластов пшеницы теплоустойчивого сорта Шарг в течение 15, 45, 30, 60 минут, при действии высокой температуры (42°C) и различных концентраций экзогенной H_2O_2 (1мМ и 10 мМ).

Методы исследований. Объектом исследования служили хлоропласты, выделенные из средней части листьев 14-дневных проростков пшеницы (*Triticum aestivum L*) теплоустойчивого сорта Шарг проростков по методике [6].

Для создания теплового шока суспензия помещалась в увлажненный термостат при 42 °С. Контролем служила суспензия, выдерживаемая при комнатной температуре (22-23°C).

Направленное увеличение содержания H_2O_2 в хлоропластах достигалось введением его экзогенно в конечных концентрациях 1 или 10 мМ, где 1 мМ H_2O_2 соответствует физиологическим концентрациям пероксида водорода, в то время как 10 мМ H_2O_2 можно рассматривать в качестве стрессирующего воздействия, приводящего к изменению работы фотосинтетического аппарата хлоропластов.

Определение глутатионового статуса хлоропластов проводилось по анализу содержания восстановленной и окисленной форм глутатиона, которое оценивалось титрометрически по методу [4].

Содержание каротиноидов оценивалось спектрофотометрически в суммарной вытяжке пигментов, согласно описанной методике, приведенной в работе [1].

Результаты и обсуждение. Помещение суспензии хлоропластов в условия 42°C приводило к постепенному окислению пластидного пула глутатиона на фоне неизменного общего содержания данного антиоксиданта, выраженного в GSH-эквивалентах (табл. 1).

Таблица 1

Содержание глутатиона в суспензии хлоропластов пшеницы сорта Шарг при действии теплового стресса

Время обработки, мин	GSH, мкМоль/мг белка	GSSG, мкМоль/мг белка	GSH+GSSG (GSH-эквиваленты), мкМоль/мг белка
0	11,55 ± 0,14	2,0 ± 0,2	15,8 ± 0,2
5	11,42 ± 0,26	1,9 ± 0,3	15,5 ± 0,3
10	11,05 ± 0,12	2,1 ± 0,6	15,3 ± 0,6
15	10,59 ± 0,19	2,3 ± 0,4	15,1 ± 0,3
30	10,62 ± 0,20	2,5 ± 0,6	15,5 ± 0,6
60	9,74 ± 0,27	3,2 ± 0,3	16,1 ± 0,3

При этом соотношение GSSG/GSH, отражающее общий redox-статус пластид, увеличивалось от 0,17 до 0,34 через 60 минут прогрева (рис.1).

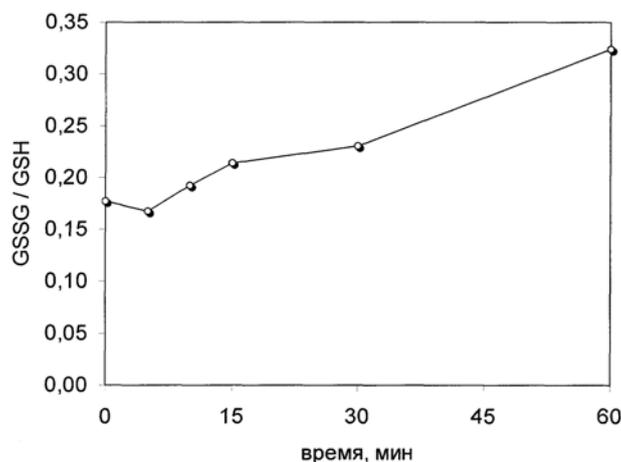


Рис. 1. Динамика отношения GSSG/GSH в хлоропластах пшеницы сорта Шарг при действии 42 °С.

Относительно медленный, линейный рост данного показателя свидетельствует о последовательном развитии при высокотемпературной обработке окислительного стресса, способного модифицировать метаболизм органелл в соответствии с изменившимися условиями среды [11].

Действие теплового воздействия приводило также к увеличению концентрации каротиноидов в хлоропластах уже через 10 минут прогрева (табл. 2). К 15 минуте теплового воздействия их содержание достигало максимума, а впоследствии постепенно снижалось к исходному уровню.

Таблица 2

Содержание каротиноидов в суспензии хлоропластов пшеницы сорта Шарг при действии 42 °С

Время обработки, мин	Содержание каротиноидов, мг/л	% от контроля
0	19,17 ± 0,28	100
5	20,15 ± 0,16	105
10	21,08 ± 0,27	109
15	22,41 ± 0,27	116
30	20,3 ± 0,3	106
60	19,1 ± 0,3	99

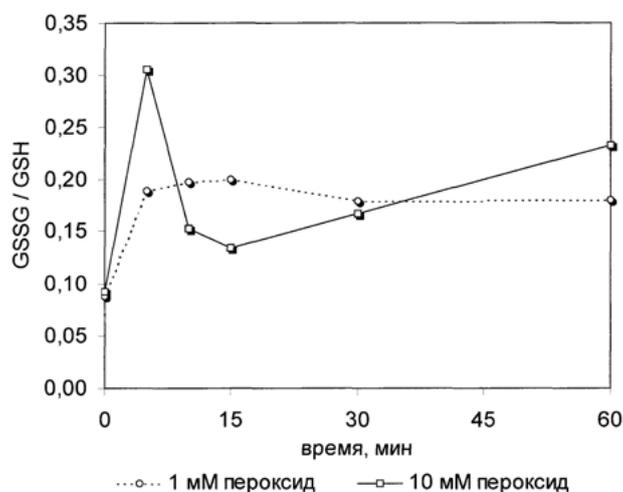
Полученные результаты свидетельствуют о способности хлоропластов к адаптивной активации синтеза данных соединений и их существенной роли в защите фотосинтетических мембран при действии повышенной температуры.

При введении в суспензию хлоропластов экзогенного H_2O_2 в обеих концентрациях сохранялся исходный размер общего пула глутатиона, хотя и наблюдалась тенденция к некоторому снижению, но она не носила достоверного характера (табл. 3).

В отличие от теплового воздействия, снижение абсолютной и относительной концентрации восстановленного глутатиона и рост отношения GSSG/GSH (рис. 2) происходили уже через 5 минут после обработки. В течение всего эксперимента (60 минут) не отмечалось возвращения степени окисленности глутатиона к исходным значениям. При действии 1 мМ H_2O_2 показатель GSSG/GSH возрастал в 2 раза и оставался в пределах

Содержание глутатиона в суспензии хлоропластов пшеницы сорта Шарг при действии экзогенной H₂O₂

Время обработки, мин	GSH, мкМоль/мг белка	GSSG, мкМоль/мг белка	GSH+GSSG (GSH-эквиваленты), мкМоль/мг белка
1 mM пероксид водорода			
0	18,0 ± 0,3	1,6 ± 0,6	21,1 ± 0,5
5	15,2 ± 0,3	2,9 ± 0,5	20,9 ± 0,4
10	14,1 ± 0,2	2,8 ± 0,4	19,6 ± 0,3
15	15,1 ± 0,2	3,0 ± 0,3	21,1 ± 0,3
30	14,1 ± 0,3	2,5 ± 0,5	19,1 ± 0,4
60	14,4 ± 0,3	2,6 ± 0,4	19,6 ± 0,3
10 mM пероксид водорода			
0	16,3 ± 0,3	1,5 ± 0,4	19,3 ± 0,6
5	11,4 ± 0,3	3,5 ± 0,5	18,6 ± 0,4
10	14,4 ± 0,5	2,1 ± 0,6	18,3 ± 0,6
15	13,9 ± 0,2	1,9 ± 0,3	17,7 ± 0,2
30	12,9 ± 0,3	2,2 ± 0,5	17,3 ± 0,4
60	12,1 ± 0,3	2,8 ± 0,5	17,8 ± 0,4

Рис.2. Динамика показателя GSSG/GSH в хлоропластах пшеницы сорта Шарг при обработке экзогенным H₂O₂.

0,35-0,4 в течение всей последующей экспозиции (рис.2). Большая концентрация H₂O₂ вызывала более сложную ответную реакцию глутатионовой системы: резкий пик отношения GSSG/GSH через 5 минут после внесения H₂O₂ (в 3 раза выше контроля), последующее снижение к 10-15 минутам и повторное постепенное увеличение к часу после обработки (до 0,45). Как видно из рис.2, за исключением первоначального пика, показатель GSSG/GSH при введении 10 mM H₂O₂ превысил таковой для 1 mM H₂O₂ только через 60 минут экспозиции.

Что касается содержания в мембранах хлоропластов каротиноидов, то их концентрация при действии H₂O₂ оставалась неизменной (табл. 4). Ни 1, ни 10 mM H₂O₂ не при-

водили к адаптивному увеличению либо наоборот, деструкции каротиноидов, что может обуславливаться зависимостью их синтеза в первую очередь от состояния фотосистем или электрон-транспортной цепи (ЭТЦ), но не от содержания АФК как такового. Подобное предположение подтверждается тем, что к настоящему времени показана зависимость биосинтеза данных соединений в развивающихся хлоропластах от организации светособирающих антенных комплексов и реакционных центров фотосистем [10]. Кроме того, установлена тесная зависимость работы ферментов синтеза каротиноидов от пластохинонового биосинтетического пути [7].

Таблица 4

Содержание каротиноидов в суспензии хлоропластов пшеницы сорта Шарг при действии экзогенного H₂O₂

Время обработки, мин.	1 мМ H ₂ O ₂		10 мМ H ₂ O ₂	
	Содержание каротиноидов, мг/л	% от контроля	Содержание каротиноидов, мг/л	% от контроля
0	19,14 ± 0,09	100	19,3 ± 0,3	100
5	18,42 ± 0,27	96	19,01 ± 0,13	99
10	18,46 ± 0,28	96	19,02 ± 0,29	100
15	18,9 ± 0,3	99	19,61 ± 0,25	102
30	18,78 ± 0,15	98	19,9 ± 0,3	104
60	18,8 ± 0,4	98	19,6 ± 0,4	102

Полученные результаты свидетельствуют о значительной роли глутатиона в поддержании функциональной активности хлоропластов в условиях действия изученных стрессов. Увеличивающиеся потребности в восстановленной форме данного соединения обеспечиваются за счет работы системы рециклирования глутатиона на фоне неизменно общего пула данного соединения.

Возможность адаптивного увеличения содержания в хлоропластах каротиноидов через 5-10 минут после действия изучаемых стрессирующих воздействий также говорит о важной роли данных соединений в защите фотосинтетических мембран. Регуляция синтеза каротиноидов осуществляется, по-видимому, с участием фотосистем или электрон транспортной цепи (ЭТЦ) хлоропластов, но не содержания АФК в хлоропластах. В связи с этим увеличение их содержания отмечалось только при действии высокой температуры, но не при обработке экзогенной H₂O₂.

Таким образом, из вышепредставленных результатов можно заключить о некоторой универсальности немедленного ответа низкомолекулярной АО-системы защиты хлоропластов на действие исследованных неблагоприятных факторов (42⁰С, 1 и 10 мМ H₂O₂). В то же время индивидуальные ответы на каждое неблагоприятное воздействие обладают определенной специфичностью. В частности, активность глутатионового потенциала зависела от интенсивности воздействия, а в случае каротиноидов от состояния фотосинтетического аппарата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Методы биохимического исследования растений / Под ред. А.И.Ермакова. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 430 с.
2. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. – М., 2007. – С. 139.
3. Стржалка К., Костецка-Гугала А., Латовски Д. Каротиноиды растений и стрессовое воздействие окружающей среды: роль модуляции физических свойств мембраны каротиноидами // Физиол.

- раст., 2003. – Т. 50, № 2. – С.188-193.
4. Удинцев Г.Н., Бланк В.Б., Кравец Д.А., Тимесков И.С. Пособие по лабораторным методам исследования. – М.: Медицина, 1982. – 58 с.
 5. Фрайкин Г.Я., Страховская М.Г., Рубин А.Б. Индуцированные светом процессы защиты клеток от фотоповреждений // Биохимия, 2000. – Т. 65, вып. 6. – С. 865-875.
 6. Arnon D.L., Allen M.B., Whatley L.B. Photosynthesis by isolated chloroplasts. Genetic concept and comparison of free photochemical reactions // Biochim. Biophys. Acta, 1956. Vol. 20, № 2. – P. 449.
 7. Bartley G.E., Scolnik P.A. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health // The Plant Cell, 1995. – Vol. 7. – P. 1027-1038.
 8. Clarke S.F., Guy P.L., Burritt D.J., Jameson P.E. Changes in the activities of antioxidant enzymes in response to virus infection and hormone treatment // Physiol. Plant, 2002. – Vol. 114. – P. 157-164.
 9. Conklin P.L. Vitamin C: a new pathway for an old antioxidant // Tr. Plant Sci., 1998. – Vol. 3, № 9. – P. 329-330.
 10. Cunningham F.X. Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants // Pure Appl. Chem., 2002. – Vol. 74, № 8. – P. 1409-1417.
 11. Schafer F.Q., Buettner G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple // Free Rad. Biol. Med., 2001. – Vol. 30, № 11. – P. 1191-1212.

N. Gambarova

COMPARISON OF PECULIARITY OF ACTION OF THE HEAT AND OF EXTERNAL INTRODUCTION H_2O_2 ON ACTIVITY OF ANTIOXYDANT SYSTEM CHLOROPLASTS OF WHEAT

Abstract. Peculiarity action of a heat and of external introduction H_2O_2 on process use of glutation are investigated, and also the content carotinoids in chloroplasts of wheat of a grade of Sharg within 5, 10, 15, 30, 60 minutes. As a result of researches has been found out a considerable role of glutation in support of functional activity chloroplasts at action as heat, and of external introduction H_2O_2 . The adaptive increase of content in chloroplasts of carotinoids already through 5-10 mines after the beginning of action investigated stressors confirmation about the important role of the given substances in protection of photosynthetic membranes.

Key words: antioxydant system (joint-stock company), glutation, carotinoids, exposition, stress, adaptation.